

0- 803799

*На правах рукописи*



**АХМЕТОВА АЛИНА ИЛЬДУСОВНА**

**$\beta$ -ПРОПЕЛЛЕРНАЯ ФИТАЗА *BACILLUS GINSENGINUM*:  
КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА, ОЧИСТКА БЕЛКА, СВОЙСТВА ФЕРМЕНТА**

**03.02.03 –микробиология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Казань – 2013**

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биотехнологии ферментов кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: д.б.н. проф. Шарипова Маргарита Раминовна

Официальные оппоненты: д.б.н. Дегтярева Ирина Александровна,  
Государственное научное учреждение Татарский научно-исследовательский институт агрохимии и почвоведения Россельхозакадемии, заведующий лабораторией

НАУЧНАЯ БИБЛИОТЕКА КФУ



851867

к.б.н. Куликов Сергей Николаевич,  
Федеральное бюджетное учреждение науки «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Государственное научное учреждение Татарский Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Российской академии сельскохозяйственных наук, г.Казань

Защита диссертации состоится «26» декабря 2013г. в 13.00 ч на заседании диссертационного совета Д.212.081.08 при ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание, аудитория №211.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского (Приволжского) федерального университета по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Автореферат разослан «26» ноября 2013 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор

З. И. Абрамова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Значительную долю в рационах моногастричных животных занимают пшеница, ячмень, рожь и другие зерновые культуры, обладающие не только питательными, но и отрицательными свойствами (Tran J. *Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2010). В злаках, бобовых и семенах масличных культур содержится фитиновая кислота, которая связывает фосфор и делает корма на 70-80% недоступными для переваривания животными. Это ограничивает использование перечисленных культур в кормлении и, особенно, при разработке высоко - концентрированных рационов для интенсивного выращивания животных и птицы (Ramesh A., *Indian J. Microbiol.*, 2011). Фитиновая кислота - это специфическое химическое соединение шестиатомного спирта инозитола, по гидроксильным радикалам которого связано 6 остатков фосфорной кислоты (Kumar V., *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2013). Остатки фосфорной кислоты химически активны и связывают ионы металлов - кальций, натрий, калий, цинк, медь. Фитиновая кислота также взаимодействует с остатками аминокислот, переводя их в недоступное для растений и бактерий состояние. Соли фитиновой кислоты - фитаты - составляют почти 50% от общего органического фосфора и более 80% от общего фосфора в кормах растительного происхождения (Ramesh A., *Indian J. Microbiol.*, 2011).

Переводить фитаты в доступное состояние путем высвобождения фосфатов способны бактерии. Они гидролизуют эти соединения с помощью ферментов - фитаз (Coban H., *Bioprocess Biosyst Eng.*, 2013). Это особая группа фосфомоноэстераз, способных гидролизовать фитат на более доступные фосфатсодержащие соединения. Фитазы практически не вырабатываются в пищеварительном тракте свиней, птицы и других животных с однокамерным желудком (Jorquera M., *FEMS Microbiol Ecol.*, 2012). Как правило, в условиях низкой активности или полного отсутствия фитаз фитиновый фосфор и связанные с ним полезные питательные вещества, проходят желудочно-кишечный тракт транзитом (George T., *FEMS Microbiol Ecol.*, 2009).

Существует острая необходимость в разработке новых наукоемких биотехнологий, основанных на использовании бактериальных ферментов, которые могут служить кормовыми добавками для утилизации фитатов. Поэтому вопросы, связанные с поиском микроорганизмов-продуцентов фитат-гидролизующих ферментов, получении этих белков, изучением структуры и свойств микробных фитаз, а также созданием на их основе новых биотехнологий являются актуальным и направлены на решение этой проблемы.

**Цель работы** – изоляция и характеристика штаммов бактерий обладающих фитат-гидролизующей активностью, клонирование гена фитазы, очистка белка и изучение его свойств.

**Основные задачи исследования:**

1. Поиск и выделение грамположительных микроорганизмов, обладающих фитат-гидролизующей активностью, из образцов почв республики Татарстан.
2. Клонирование и секвенирование гена фитазы штамма изолята, получение рекомбинантного штамма с высокой активностью фермента.
3. Разработка метода выделения и очистки фитазы *B.ginsengihumi* M2.11, установление первичной структуры и свойств фермента.
4. Определение токсичности и биологических свойств *B.ginsengihumi* M2.11 – продуцента фитазы.

#### **Научная новизна**

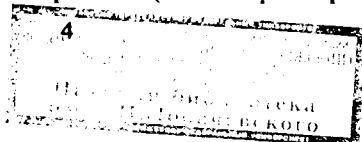
Впервые из образцов почв республики Татарстан изолирован штамм *B.ginsengihumi* M2.11 с высокой фитат-гидролизующей активностью, клонирован ген фермента и установлена его последовательность. Получен эффективный вектор экспрессии с геном фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 и рекомбинантный штамм, позволяющий получать белок в препаратных количествах. Разработан метод очистки бактериальной фитазы, включающий аффинную, ионообменную хроматографию и гель-фильтрацию. Установлена первичная структура фитазы *B.ginsengihumi* M2.11. Фермент принадлежит к классу  $\beta$ -пропеллерных фосфатаз с молекулярной массой 41 кДа, изoeлектрической точкой pI 4.8. Полученные данные о свойствах фермента пополняют знания о  $\beta$ -пропеллерных фитазах бактерий.

#### **Практическая значимость результатов**

Выделенный из образцов почв республики Татарстан штамм *B.ginsengihumi* M2.11 обладает фитат-гидролитической активностью, не токсичен и оказывает стимулирующее влияние на рост и развитие картофеля и может быть использован в сельском хозяйстве как биоудобрение, стимулирующее рост и развитие растений, а также в качестве кормовой добавки в животноводстве для повышения продуктивности. Разработанный метод очистки фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 может служить основой для его использования в биотехнологии растений и сельском хозяйстве.

#### **Связь работы с научными программами.**

Работа выполнена в соответствии с планом НИР Казанского (Приволжского) федерального университета (№ гос. регистрации 01:02.00



104982 «Биосинтез, биогенез, классификация, физиологические функции новых микробных ферментов и возможные области их практического применения»). Исследования выполнены при поддержке грантов для молодых ученых от Академии наук республики Татарстан №13-20/Г-2010 и №13-24/2011, грантов Германской службы академических обменов DAAD по программе «Евгений Завойский» № А/10/85937 и № А/12/71727, гранта РФФИ 12-08-00942а, Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009-2013 гг.: ГК № ПЗ44, ГК № П406, ГК № ПЗ23, ГК № 815, ГК № 1053, соглашения №14.132.21.1786 и 14.А18.21.0575.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Изолирован и идентифицирован новый продуцент фитазы *B.ginsengihumi* M2.11, ген фермента клонирован и секвенирован, белок очищен, классифицирован как  $\beta$ -пропеллерная фосфатаза, изучены энзиматические свойства фермента.
2. Штамм *B.ginsengihumi* M2.11– продуцент фитазы - не токсичен в отношении растений и стимулирует их рост и развитие.

#### **Апробация работы**

Основные положения диссертации представлены на международных научных конференциях: IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» Казань, 2009), научно-практическая конференция биохимиков, посвященная памяти профессора В.Г.Винтера «История и достижения Казанской биохимической школы» Казань, 2009), XIII annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE 2009” “Biology: Expansion of Borders” (Казань, 2009), XIII annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE 2009” “Biology: Expansion of Borders” Эскишехир, Турция, 2010), на российской школе молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии» (Казань, 2010), XV annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE 2011”, (Базель, Швейцария, 2011), “Students, Masters and PhD Students III Annual International Scientific Conference in Biology” dedicated to the Academician Peter Komietiani (Тбилиси, Грузия, 2011), XIX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2012), XVI annual Symposium for Biology Students of Europe “SymBioSE 2012” (Szeged, Hungary, 2012), открытом конкурсе научных работ студентов и аспирантов им. Н.И. Лобачевского (Казань, 2012), международном конкурсе 2012 года «Russia Graduate competition for Alltech’s Young Scientist Award», III Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), XX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов

и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2013), IV Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Уфа, 2013), Federation of European Biochemical Societies CONGRESS 2013 “Mechanisms in Biology” (FEBS) (Санкт-Петербург, 2013).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для публикации материалов диссертации, 1 учебно-методическое пособие.

**Благодарности.** Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю д.б.н., профессору кафедры микробиологии М.Р. Шариповой за постановку проблемы, внимательное отношение к работе и обсуждение полученных результатов; к.б.н., доц. А.М. Мардановой и к.б.н., с.н.с. Н.П. Балабан за постоянные консультации и обсуждение результатов; профессору Удо Хайнеманну за научные консультации по фитазам микроорганизмов, а также за возможность проведения исследований на базе Института Молекулярной Медицины Макса Дельбрука г. Берлин, Германия; профессору Фикреттину Шахину за сотрудничество и возможность проведения экспериментов по утилизации труднодоступных соединений в лаборатории университета Йедитепе г. Стамбул, Турция. Автор выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой микробиологии Казанского федерального университета д.б.н., профессору, академику АН РТ О.Н. Ильинской и всем сотрудникам кафедры за всестороннюю помощь и поддержку.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы и список литературы. Работа изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 9 таблиц и 45 рисунков. Библиография содержит 84 наименований российских и зарубежных авторов.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Отбор и скрининг почвенных образцов.** Отбор образцов почв проводили на различных территориях республики Татарстан в сентябре 2009: государственного унитарного предприятия агрокомбината «Майский» г. Казань, Казанского совхоза «Тепличный», лесной зоны д. Агерзе Азнакаевского района, приусадебного хозяйства с. Нижний Услон, придворовой зоны Казанского (Приволжского) федерального университета. Учет микроорганизмов проводили методом посева на среду PSM с фитатом натрия в качестве единственного источника фосфора.

**Питательные среды и условия культивирования.** Селекцию фитат-гидролизующих штаммов микроорганизмов проводили на фитат-содержащей среде PSM (Phytase Screening Medium) (Sasirekha, Euro. J. Exp. Bio., 2012). Культивирование бактерий проводили на среде LB (Sambrook and Russell,

2001). Для индукции экспрессии гена фитазы рекомбинантного штамма использовали среду на основе насыщенного бульона TB (Terrific Broth) (Geerloff A., Helmholtz Center Munich Protocols, 2010), а также использовали коммерческую экспресс-среду TB (Overnight Express Instant TB Medium, Novagen) (Scheich C., Nucleic Acids Res., 2007). Для изучения влияния бактерий на рост растений использовали соевую агаризованную среду на основе триптона TSA (Tryptic Soy Agar) (Leavitt J., The NY J. Dentist., 1955).

**Штаммы бактерий и плазмиды.** В работе использовали штаммы: *E. coli* XLI-Blue, *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* Rosseta 2 (DE3) T1<sup>R</sup>; плазмиды: *pTZ57R/T*; *pQlinkH*, *pQlinkG* и *pET-46* (с His-tag). Штамм *Xanthomonas sp.* Xav5 использовали в тесте на определение токсичности в качестве контрольного фитопатогенного микроорганизма.

**Микробиологическая система идентификации (Microbial Identification System, Version 6.2)** Родовую принадлежность микроорганизмов определяли с помощью системы микробной идентификации на основе газохроматографического анализа метиловых эфиров жирных кислот клеточной мембраны бактерии. 20 часовую культуру бактерий собирали с агаризованной среды LB и помещали в пробирку. Выделяли фракцию эфиров для анализа как описано в методике (MIS Operating Manual, Version 6.2, 2012) Фракции помещали в хроматографические колонки и устанавливали в анализатор (Agilent GC 78900 Series).

**Идентификацию микроорганизмов** проводили на основе анализа последовательности гена 16S рPHK с использованием стандартных праймеров: 27F (5' GAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') и 1525R (5' ACGGTTACCTTGTTACGACTT 3').

**Активность фитазы** определяли по количеству высвободившегося фосфора при гидролизе фитанатрия по методу Грайнера (Greiner R., Can.J. Microbiol., 2007). За единицу активности принимали количество фермента, гидролизующего в условиях эксперимента 1 мМ субстрата за 1 мин.

**Выделение ДНК из клеток бацилл** проводили с помощью реактивов «GeneJet Genomic DNA Purification Kit», «GeneJET Plasmid Miniprep Kit» («Fermentas») согласно прилагаемому протоколу.

**Клонирование гена *phyBg* в плазмиду *pET-LIC*** проводили с помощью праймеров, содержащих комплементарные нуклеотиды для отжига, старт -, стоп-кодона и последовательности, кодирующие His-tag на N-конце. Амплификат гена фитазы клонировали в вектор *pET-46LIC*, который трансформировали в компетентные клетки *E. coli* DH5 $\alpha$ . Анализ рекомбинантных плазмид проводили с помощью ферментов рестрикции *Bam*HI

и *NotI*, ПЦР-реакции. Вектор *pET-LIC/Phy* трансформировали в коммерческий штамм-реципиент *E.coli* Rosseta 2 (DE3) T1<sup>R</sup>. Трансформанты выращивали на селективной среде ТВ с хлорамфениколом и карбенициллином (100 мг/мл).

**Рестрикционное картирование ДНК** проводили набором рестриктаз фирмы «Fermentas» в течение 2 ч при 37°C в условиях, рекомендованных производителем.

**Лигирование ДНК** проводили при температуре 4°C в течение ночи в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 3 мкл лигазного буфера и 5 ед. акт. лигазы T4 («Сибэнзим») на 1 мкг ДНК.

**Трансформацию клеток *E.coli* плазмидной ДНК** проводили как описано в работе (Sambrook et al., 1989).

**Выделение ДНК из агарозного геля** осуществляли с помощью набора реактивов «Gel Extraction kit» (Fermentas).

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили в термоциклере «MJ mini» производства фирмы «BioRad» (США) с использованием Pfu-полимеразы и Taq-полимеразы фирмы «Сибэнзим», как описано (Sambrook J., Molecular Cloning, 1989).

**Электрофорез** проводили в горизонтальном агарозном геле (1%).

**Иммуноблоттинг.** Клетки рекомбинантного штамма разрушали с помощью ультразвука (20-50 кГц). Лизаты разделяли в SDS-ПААГ как описано в (Sambrook J., MolecularCloning, 2001). Western blot проводили как описано в методике (Sambrook J., MolecularCloning, 2001).

**Секвенирование ДНК** осуществляли в фирме «Синтол», г.Москва.

**Выделение и очистку белка** проводили из клеток рекомбинантного штамма *E.coli* Rosseta *pET-LIC/Phy*, разрушенных с помощью френч-прессав буфере, содержащем 50 mM Трис-HCl, pH 8.0, протеиназу, 1 мг/мл (Fermentas) и ДНКазу, 1 мг/мл (Fermentas). Для очистки использовали аффинную хроматографию на основе Ni-гранул в 25 mM Трис-HCl буфере, pH 8.0, хроматографию на Q – Sepharose в 25 mM Трис-HCl, pH 8.0буфере и гель-фильтрацию белка на колонке Sephadex G200, уравновешенной 10 mM Нерес буфером, pH7.5 с добавлением 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Степень чистоты препаратов и молекулярную массу определяли методом электрофореза в 12.5%-ном ПААГ в присутствии SDS по методу Лаэммли (Laemmli U., Nature, 1970).

**Белок определяли** спектрофотометрически, считая, что концентрация белка 1 мг/мл соответствует  $A_{280} = 1$  оптической единице (опт. ед.) в кювете толщиной 1 см, а также по методу Брэдфорда (Bradford M., Analyt. Biochem, 1976).



### **pH-оптимум и pH-стабильность**

pH-Оптимум фермента определяли по гидролизу фитата натрия в 0.1M натрий ацетатном буфере, pH 5.0- 5.5, 0.1M трис-малатном буфере, pH 6.0– 7.0 и в 0.1 M трис-HCl буфере pH 7.5 – 9.0. Для определения pH-стабильности фермент предварительно инкубировали в 0.1M буфере при pH 5.0– 9.0 в течение 24 ч при комнатной температуре и определяли активность.

### **Температурный оптимум и термостабильность**

Температурный оптимум определяли по гидролизу фитата натрия в 0.1 M натрий ацетатном буфере pH4.5, инкубируя реакционную смесь при температурах 4, 17, 25, 30, 37, 42, 50, 60, 70, 80, 95°C. При изучении термостабильности растворы фермента предварительно инкубировали 40 мин при температурах от 4° до 95°C и затем определяли активность фитазы.

### **Влияние ионов металлов на активность фитазы**

Для изучения влияния ионов двухвалентных металлов на активность фитазы использовали соли:  $MgCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $ZnCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $MnSO_4$ ,  $FeSO_4$  и  $CuSO_4$  в конечной концентрации 2 mM. К ферментному раствору добавляли растворы солей двухвалентных металлов и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 мин, затем определяли активность фермента по гидролизу фитата натрия и выражали в процентах относительно контроля. Контролем (100%) служил уровень активности фермента в отсутствие ионов металлов.

Субстратную специфичность фитазы определяли по гидролизу фосфорилированных субстратов в концентрации 3mM: фитат натрия, нитрофенилфосфат, глицерофосфат, глюкозо-6-фосфат, аденозинтрифосфата (АТФ).

### **Масс-спектрометрический анализ (MALDI-TOF).**

Ферментобрабатывали трипсином по методике, изложенной на сайте (<http://www.bioc.uzh.ch>). Пептиды различной молекулярной массы идентифицировали на масс-спектрометре Vision 2000 TOF («Thermo Bioanalysis», Великобритания). Данные обрабатывали с помощью программ PeptideMassFingerprint (<http://www.matrixscience.com>.) и PeptideMass (<http://cn.expasy.org>). Изoeлектрическую точку фермента определяли с использованием ресурса <http://web.expasy.org/protparam/>.

### **Геноинформатика**

Выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритмов BLAST: пакета программ, представленных на сервере NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и биоинформационного портала ExPASy (<http://www.expasy.org>).

**Влияние штамма *B.ginsengihumi* M2.11 на рост картофеля** изучали по методу Эситкена (Esitken A., Scientia Horticulturae, 2010).

**Определение токсичности штамма *B.ginsengihumi* M2.11** проводили по методу Котана (Kotan R., J. Plant Diseases and Protection, 2006). В качестве контроля использовали лабораторный штамм фитопатогенных бактерий *Xanthomonas sp.* Xav5.

#### **Математическая обработка результатов**

Для статистического анализа экспериментальных данных использовали программу MicrosoftExcel. Для описания и сравнения признаков использовали построения 95%-ных доверительных интервалов для средних значений.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **1. Выделение изолятов фитат-гидролизующих бактерий и их характеристика**

Для поиска фитат-гидролизующих микроорганизмов проводили отбор проб различных образцов почв республики Татарстан: Агрокомбината «Майский» (Казань), леса д.Агерзе Азнакаевского района, придворовой зоны КФУ, Казанского Тепличного совхоза, приусадебного хозяйства с. Нижний Услон, приусадебного хозяйства «Нармонки» Лаишевского района. На среде с фитатом из образцов почвы ГУП Агрокомбината «Майский» выделили  $29 \times 10^3$  КОЕ / 1 г почвы, леса д.Агерзе Азнакаевского района – более  $100 \times 10^3$  КОЕ / 1 г почвы, с образцов придворовой зоны КФУ – около  $5 \times 10^3$  КОЕ / 1 г почвы, Казанского Тепличного совхоза –  $0.4 \times 10^3$  КОЕ / 1 г почвы. Для работы мы отобрали 12 штаммов микроорганизмов с максимальной зоной гидролиза фитата. Изоляты высевали на фитат-содержащую среду и инкубировали при 37°C в течение 5 суток, затем проводили измерение зон гидролиза фитата (рис. 1).

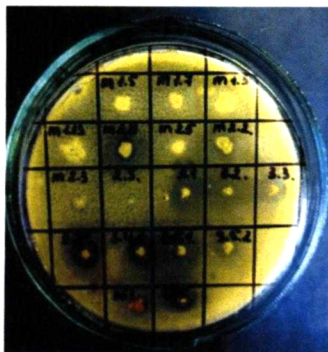


Рис.1. Рост изолированных микроорганизмов на фитат-содержащей среде.

Отобрали 5 штаммов-изолятов с максимальными зонами просветления, четыре из которых являлись грамотрицательными палочками (0.6х6 мкм). Пятый изолят М2.11 мы идентифицировали как грамположительные бактерии. Идентификацию изолятов проводили при помощи микробиологической системы идентификации (Microbial Identification System), основанной на анализе липидов цитоплазматических мембран. По результатам MIS-анализа установили, что изолированный штамм М2.11 с фитат-гидролизующей активностью является представителем рода *Bacillus*, идентичность состава клеточной мембраны изолята с клеточной мембраной бацилл составила 97.3%. Сравнительный анализ ПЦР - продукта гена 16S рРНК изолированного штамма позволил нам выявить высокую гомологию гена 16S рРНК с геном 16S рРНК штамма *Bacillus ginsengihumi* ANA12 (HQ219843.1): идентичность генов составила 97% (895 нуклеотида из 915).

Таким образом, из образцов почв республики Татарстан нами выделен грамположительный штамм *B.ginsengihumi* М2.11.

Клетки односуточной культуры (4-8х0.8 мкм) *B.ginsengihumi* М2.11 были палочковидной формы, соединены в короткие цепочки, образовывали круглые колонии с гладкой поверхностью и ровными краями, пигмент не образовывался. В процессе роста среда становилась мутной, появлялся осадок. Пленка на поверхности не образовывалась. Овальные споры штамма не превышали диаметра клеток и появлялись на 24 ч роста (не более 5%), далее их количество нарастало и достигало максимального значения (до 80%) на 42 ч культивирования (рис. 2). При определении динамики роста и накопления фитазной активности в культуральной жидкости *B.ginsengihumi* М2.11 установили, что активность фермента появлялась в культуральной жидкости на 6-й ч роста и сохранялась на протяжении всех фаз роста бактерий.

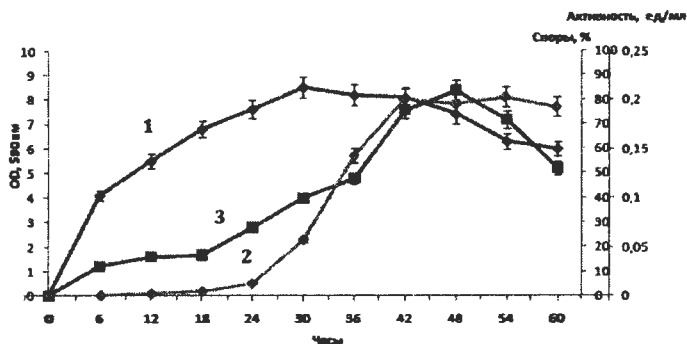


Рис.2. Динамика роста (1), спорообразования (2) и накопления фитазной активности (3) в культуральной жидкости *B.ginsengihumi* М2.11.



последовательностям генов фитаз *A.ficum* (AN AF537344.1) и *A.awamori* (AN DQ192035.1) на 92%.

### 3. Амплификация гена фитазы и подбор оптимальный условий для полимеразной цепной реакции

На основании высокой гомологии генов мы сконструировали праймеры для клонирования гена фитазы *B.ginsengihumi* M2.11. Для этого использовали последовательность гена фитазы *B.subtilis* 168 (ANNC000964.3). Праймеры NCBI-dir и NCBI-rev подобрали с помощью программы Primer BLAST на сервере NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), другая пара праймеров ORF-dir и ORF-rev ограничивала полную рамку считывания гена. С помощью 2-х пар праймеров проводили амплификацию гена фитазы с ДНК *B.ginsengihumi* M2.11. Размер ПЦР-продукта с применением обеих пар праймеров соответствовал 1149 п.н. и представлял амплификат гена фитазы *B.ginsengihumi* M2.11. При оптимизации условий ПЦР выяснили, что при температуре отжига 58°C и применении праймеров ORF-dir и ORF-rev специфичность отжига увеличивалась (рис. 4).

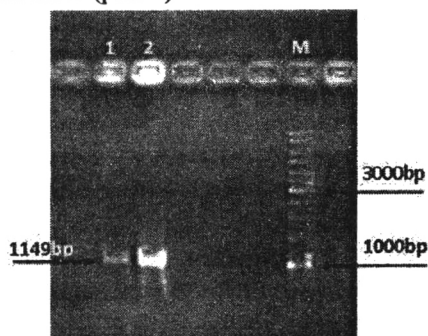


Рис.4. Электрофорез амплификата гена фитазы с геномной ДНК *B.ginsengihumi* M2.11. 1. – ПЦР-продукт, полученный при использовании праймеров NCBI- dir/ NCBI-rev, 2. - ПЦР-продукт, полученный при использовании праймеров ORF-dir/ ORF-rev, М – маркеры.

Таким образом, на основании высокой гомологии генов фитазу бациллы мы сконструировали праймеры и амплифицировали ген фитазы *B.ginsengihumi* M2.11.

Продукт амплификации очищали и секвенировали (рис. 5). Установленная последовательность нуклеотидов амплификата гена фитазы *B.ginsengihumi* M2.11, полученного с помощью праймеров, ограничивающих ORF, начиналась со старт - кодона ATG и заканчивалась стоп – кодоном TAG. Выравнивание последовательности с последовательностью гена *B.subtilis* 168

показало 100% гомологию генов и подтвердило данные геноинформационного анализа о высокой степени консервативности генов фитаз среди представителей рода *Bacillus*.

Таким образом, впервые нами определена нуклеотидная последовательность гена фитазы *B. ginsengihumi* M2.11, показана ее высокая гомология с геном фитазы *B. subtilis* 168.

```

ATGAAAGGTTCCAAAAACAATGCTGCTAAGCACTGCCGCGGGTTTATTGCTTAGCGCTGACAGCAACCTCGG
TGTGGGCTCATTATGTGAATGAGGAACATCAITTCAAAGTGACTGCACACACGGAGACAGATCCGGTGGC
ATCTGGCGATGATGCGAGGATGACCCGGCCATTTGGGTTTCATGAAAAACACCCGGAAAAAAGCAAGTTG
ATTACAACAATTAAGAGTCAAGGCTCCTTTGTGTATGATTTAGACGGAAAAACAGCTTCATTTATGAGT
TTGGCAAGCTCAATAATGTCGATCTGGCTATGATTTCCATTGAACGGCGAAAAAATGATATTTGCTGC
CGCATCCAACCGGTCCGAAGGAAAAATACAATTGAAGTATATGCAATAGACGGGATAGAGGAARATG
AAAAGCAITACAGATCCGAACCATCTTATTTCAACAAATTTCTGAGGTTTATGGATTCAAGCTTGTATC
ACAGCCAGAAAAACAGGAGCAITTTACGCATTAGTGCAGCGCAACAGGGGAATTTGAGCAGTATGAAAT
TGTTGATGCTGGAAGGGTTATGTAAACGGGAAAAAGGTGCTGAAATTAAGTTGAATTTCTCAGACCGAA
GGCCTTGTTCGGGATGATGAGTACGGAACCTATACATAGCAGAGGAAGATGAGGCCATCTGGAAATTTA
ACGCTGAGCCCGCGAGGGGTCAAGGGGCGAGGTTGTTGACCGTGGACAGAGATCAITTTACAGCTGA
TATTGAAGGACTGCAATCTATTATGCACCAATGGCAAGGATATCTCATGGCTCAAGTCAAGGAAAT
AACAGCTATGCAATGTATGAACGGCAGGGGAAAAATCGCTATGTAGCCAACTTTGAGATTACAGATGGCG
AGAAGTAGACGGTACTAGTGACACGGATGGTATTGATGTTCTCGGTTTCGGACTTGGCCCAAAATATCC
GTACGGGATTTTGTGGCGCAGGACGGCGAAAAATTTGATAACGGACAAGCCGTCAATCAAAATTTCAAA
ATTGTATCGTGGGAACAAATTCACAGCATCTCGGCGAAATGCTGATCTTCATAAACAGGTAAATCGGA
GGAGCTGAAAGACCGTTCTGACGGCTAG

```

Рис.5. Нуклеотидная последовательность гена фитазы *B.ginsengihumi* M2.11, полученная в результате секвенирования амплификата гена. Старт- и стоп- кодоны гена подчеркнуты.

#### 4. Получение рекомбинантного штамма

Амплификат гена фитазы *B. ginsengihumi* M2.11 клонировали в экспрессионный вектор *pET-46* Ek/LIC по принципу LIC – клонирования (клонирование без лигазы) (рис. 6). В основе этой системы лежит использование 3'-5'-экзонуклеазной активности T4 ДНК-полимеразы, которая в присутствии одного нуклеотида в реакционной цепи создает специфические фрагменты ДНК в векторе экспрессии и ПЦР-продукте. Высокоспецифичный отжиг образованных полимеразой комплементарных фрагментов ДНК выполняли смешиванием вставки и вектора в отсутствие лигазы.

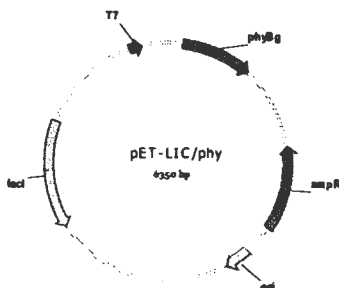


Рис.6. Схема экспрессионного вектора *pET-LIC/Phy*.

После трансформации вектора *pET-LIC/Phy* в реципиентный штамм *E. coli* DH5 $\alpha$  из рекомбинантного штамма выделяли плазмиды и анализировали их на присутствие вставки (рис. 7).

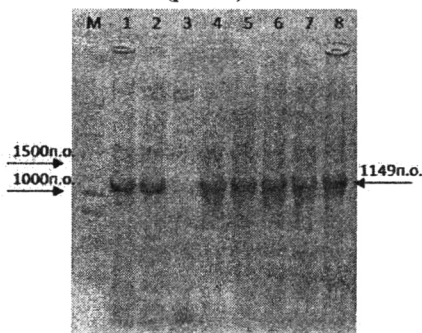


Рис.7. Электрофорез ПЦР-продуктов, полученных с рекомбинантной плазмиды. М – маркер; 1-8 – амплификаты, полученные с использованием праймеров к гену *phy* *Phy-LIC fw/rev*.

ПЦР-анализ с праймерами к гену фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 подтвердил наличие вставки в векторе экспрессии. Секвенирование вставки также показало присутствие гена фитазы в векторе. Вектор *pET-LIC/Phy* трансформировали в коммерческий беспротеазный штамм *Escherichia coli* Rosseta 2 (DE3) T1<sup>R</sup>, несущий ген устойчивости к хлорамфениколу. Трансформанты выращивали на специализированной обогатщенной среде культивирования TB с антибиотиками хлорамфениколом и карбенициллином. На 24-ый ч роста отбирали клетки, разрушали с помощью френч-пресса и анализировали лизаты на SDS-ПААГ – электрофорезе (рис. 8). Проводили анализ продуктов экспрессии с помощью иммуноблоттинга с антителами к His-tag.

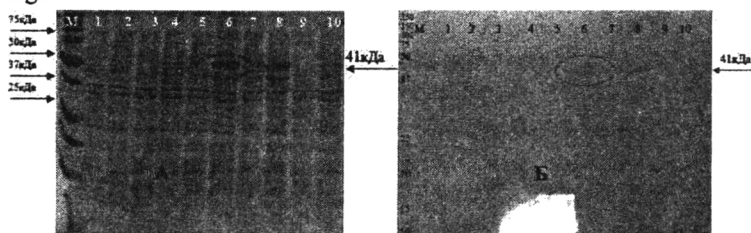


Рис.8. Электрофорез (А) и иммуноблоттинг (Б) клеточных лизатов рекомбинантного штамма *E. coli* Rosseta *pET-LIC/Phy* на 24 ч роста. М – маркеры, 1–10 – белковые продукты.

Среди продуктов экспрессии идентифицировали белок, молекулярная масса которого соответствовала 41 кДа (рис. 8А). Результаты иммуноблоттинга подтвердили, что среди продуктов экспрессии в лизатах рекомбинантного штамма присутствует белок, содержащий гистидиновые «хвосты» (His-tag). При определении фитат-гидролизующей активности в лизатах мы обнаружили активность 0.2 ед./мг биомассы.

Таким образом, в результате LIC-клонирования гена фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 получили эффективный рекомбинантный штамм *E.coli* Rosseta *pET-LIC/Phy6*, продуцирующий фитат-гидролизующий фермент бацилл.

### 5. Разработка метода очистки бациллярной фитазы

12 литров культуральной жидкости рекомбинантного штамма *E.coli* Rosseta *pET-LIC/Phy6*, центрифугировали и получали 37 г клеток. Клетки лизировали центрифугировали, супернатант использовали для выделения фермента. Для очистки фитазы из клеточных лизатов рекомбинантного штамма использовали прием аффинной хроматографии на колонке с Ni-гранулами, специфически сорбирующими His-tag-последовательности. После проведения аффинной хроматографии максимальный выход по активности фермента составил 56 %, степень очистки белка 150 (табл. 2). Ионообменная хроматография ферментного раствора на Q-сефарозе позволила увеличить степень очистки в 180 раз по сравнению с клеточным лизатом, выход по активности на этой стадии очистки составил 18%. Гель-фильтрация на колонке Sephadex G200 позволила получить хроматографически и электрофоретически гомогенный фермент (рис. 9), в результате чего получили фитазу с удельной активностью 0.2, очищенную в 500 раз с выходом по активности 9%.

Табл.2. Выделение и очистка фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 из клеточных лизатов рекомбинантного штамма *E.coli*.

Стадия очистки	V, мл	Белок общ., мкг	Общая акт-ть, ед. акт.	Удельная акт-ть, ед./мкг	Степень очистки	Выход, %
						По акт.
Клеточный лизат	80	51200	19.2	0.0004	1	100
Аффинная хроматография	12	192	10.8	0.056	150	56.25
Хроматография на Q-сефарозе	2	62.5	4.5	0.072	180	18.2
Хроматография на колонке Sephadex G200	0.7	9	1.75	0.2	500	9.1

Использованные нами приемы очистки позволили за 3 стадии получить хроматографически гомогенный препарат фитазы из лизатов рекомбинантного



штамма, молекулярная масса белка, определенная по данным электрофореза, составила 41 кДа.

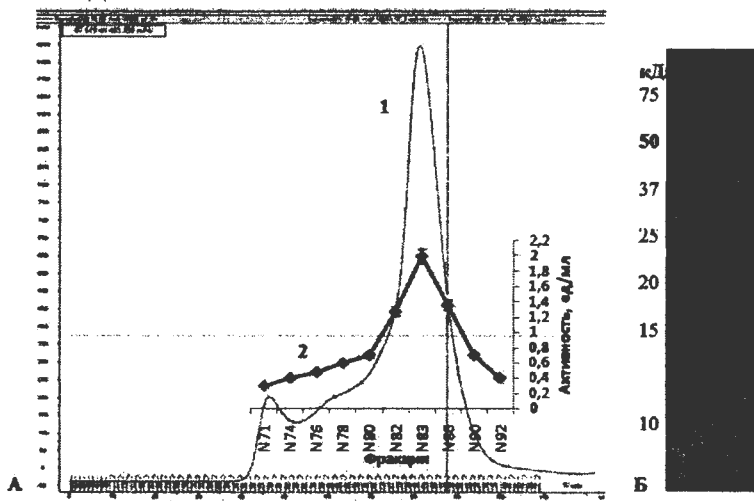


Рис.9. А - Хроматография фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 на колонке с Sephadex G200: 1 – A<sub>280</sub>, 2 - активность фермента; Б – SDS-ПААГ - электрофорез фитазы после хроматографии на Sephadex G200: маркеры молекулярных масс (1), фракция белка после всех стадий очистки (2).

## 6. Определение первичной структуры фитазы

Первичную структуру очищенной фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 устанавливали с помощью метода MALDI-TOF-масс-спектрометрии (рис. 10). Установлено, что аминокислотная последовательность фитазы полностью соответствует последовательности, конвертированной из последовательности нуклеотидов секвенированного нами гена фитазы *B.ginsengihumi* M2.11. Последовательность аминокислот фитазы включала 371 а.о., что соответствовало молекулярной массе белка 41 кДа и подтвердило данные, полученные с помощью SDS-электрофореза. Изоэлектрическая точка фитазы *B.ginsengihumi* M2.11, установленная на основании структуры белка, составила pI 4.8.

Анализ первичной структуры фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 показал наличие в молекуле белка шести консервативных сайтов связывания с кальцием, три из которых оказывают влияние на термостабильность фермента (Ca1, Ca2, Ca3) и три определяют каталитическую активность белка (Ca4, Ca5, Ca6).



помощью сервера UNIPROT (<http://www.uniprot.org>), подтвердил высокую степень идентичности структур этих ферментов (рис. 11).

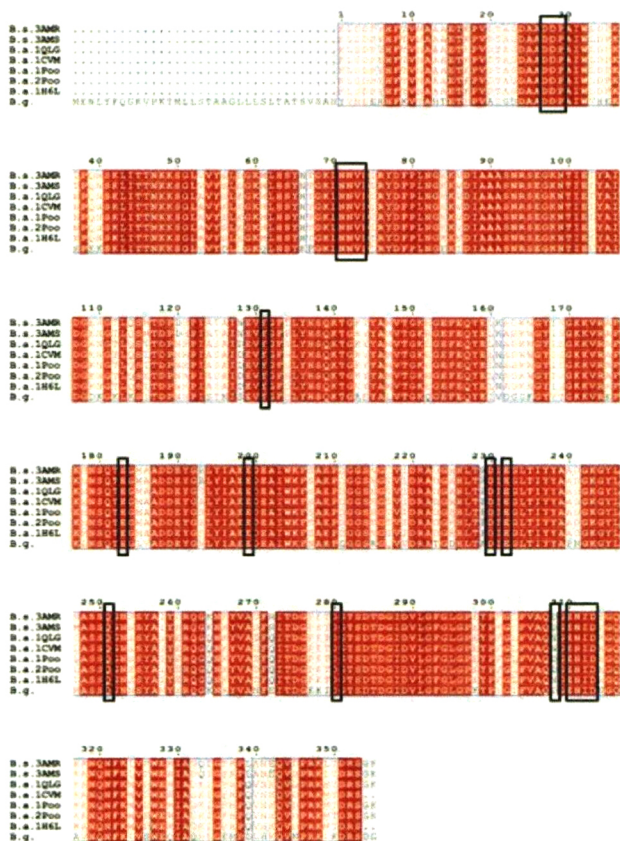


Рис.11. Выравнивание аминокислотных последовательностей фитаз бацилл(<http://www.pdb.org/pdb>) с последовательностью фитазы *B.ginsengihumi* M2.11, полученной в результате MALDI-TOF масс-спектрометрии (красным цветом окрашены одинаковые остатки). Черными боксами выделены аминокислотные остатки, координирующие шесть кальций-связывающих сайтов в структуре молекулы.

На основе первичной структуры фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 с помощью программы Phyre21 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) мы построили гипотетическую 3D-модель фитазы. Из рисунка 12Б видно, что белковая глобула содержит  $\beta$ -структуры, напоминающие шестиплостный пропеллер, так

же как и 3D-модель фитазы *B.amyloliquefaciens* в мировой базе данных PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) (рис. 12А).

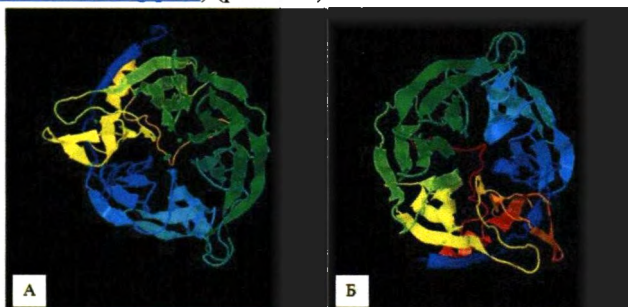


Рис.12. 3D-модели (А) - фитазы *B.amyloliquefaciens* 2POO (Å - X:50.98 Y:65.15 Z:105.68) и (Б) – фитазы (гипотетическая) *B.ginsengihumi* M2.11 (Å - X:49.624 Y:50.001 Z:59.096). Цвета радужного градиента обозначают переход от N-концевого (красный) к С-концевому (синий) домену.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что очищенная фитаза *B.ginsengihumi* M2.11 принадлежит к классу бациллярных  $\beta$ -пропеллерных фосфатаз, обладающих фитат-гидролизующей активностью.

## 7. Свойства фитазы

Определяли рН оптимум и стабильность фитазы. Установлено, что рН-оптимум фитазы в 0.1М натрий ацетатном буфере составляет рН 6.0 (рис. 13А). Белок стабилен в интервале рН от 5.0 до 9.0 (рис. 13Б).

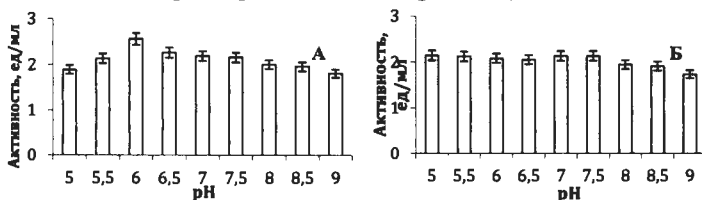


Рис.13. Влияние рН на активность фитазы *B.ginsengihumi* M2.11. А – Определение рН оптимума фермента; Б – определение рН стабильности фитазы.

При исследовании влияния температуры на активность фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 установлено, что температурный оптимум фермента соответствует 37° С (рис. 14А). Белок проявляет стабильность в интервале температур от 4 до 60° С (рис. 14Б).

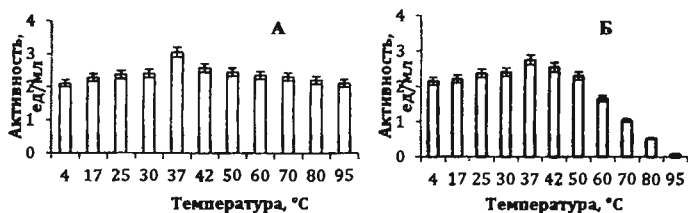


Рис.14. Влияние температуры на активность фитазы *B.ginsengihumi* M2.11. А – Определение температурного оптимума фермента; Б – определение термостабильности фитазы.

Изучение влияния ионов металлов на активность фитазы показало, что ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Ca}^{2+}$  в концентрации 2 мМ повышают активность белка до 20% (рис. 15). Двухвалентные ионы  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  ингибируют активность фермента в концентрации 2 мМ на 60 - 75%, соответственно, на 20% - ионы  $\text{Mg}^{2+}$ .

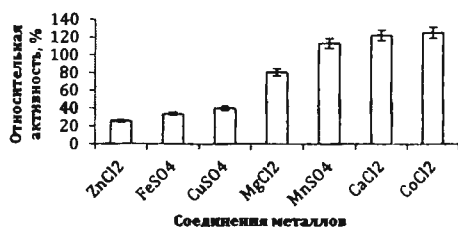


Рис.15. Влияние двухвалентных металлов на активность фитазы *B.ginsengihumi* M2.11.

Исследовали специфичность фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 по гидролизу ряда субстратов. Установили, что фитаза проявляет специфическую активность по расщеплению фитата натрия и не активна в отношении других фосфатсодержащих субстратов.

Таким образом, фитаза *B.ginsengihumi* M2.11 активируется на 20% в присутствии ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Co}^{2+}$ . Фермент стабилен в диапазоне температур от  $4^{\circ}\text{C}$  до  $60^{\circ}\text{C}$  и при pH от 5.0 до 9.0. Фитаза *B.ginsengihumi* M2.11 проявляет максимальную активность при  $37^{\circ}\text{C}$ , pH 6.0 и отличается узкой субстратной специфичностью.

#### 8. Влияние штамма *B.ginsengihumi* M2.11 на рост и развитие картофеля

Поскольку штамм *B.ginsengihumi* M2.11 выделен из почвы, мы проводили эксперименты, направленные на выяснение влияния изолята *B.ginsengihumi* M2.11 на рост растений. В качестве тестового растения использовали

картофель. В качестве контроля использовали раствор без добавления штамма-изолята (рис. 16А).



Рис.16. Модельный эксперимент с картофелем. А – контрольный образец, Б – опытный образец под воздействием штамма *B.ginsengihumi* M2.11.

Растения, обработанные *B.ginsengihumi* M2.11, отличались от контрольных растений высотой стебля ( $18 \pm 2$  против  $13 \pm 2$  мм) и большей биомассой ( $5.6 \pm 0.5$  против  $2.8 \pm 0.5$  г). Обработка семян суспензией *B.ginsengihumi* M2.11 приводила к повышению из всхожести. Таким образом, бактериальный штамм положительно влияет на рост и развитие картофеля.

Определяли токсичность выделенного нами штамма бактерии *B.ginsengihumi* M2.11. Заражали листья модельного растения *Nicotiana tabacum* клетками бацилл и фитопатогенных бактерий *Xanthomonas sp.* Xav5 в качестве положительного контроля (рис. 17). *Xanthomonas sp.* Xav5 паразитирует на листьях табака и после инъекции внутрь листа развивается инфекционный процесс. В случае, если растение способно отразить влияние посторонней микрофлоры, штамм считается не токсичным.

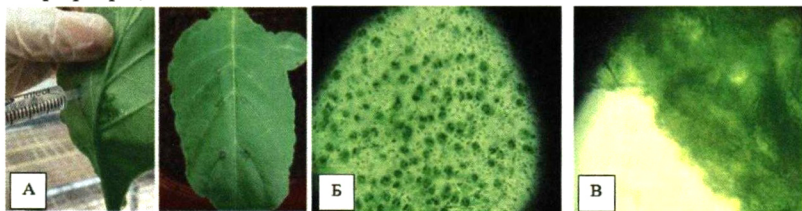


Рис.17. Инфицирование листьев *Nicotiana tabacum* штаммами микроорганизмов (А) – введение микроорганизмов в ткань листа; (Б) - листья, инфицированные *Xanthomonas sp.* Xav5; (В) - листья, инфицированные *B.ginsengihumi* M2.11.

Установлено, что растительные клетки табака противостояли действию *B.ginsengihumi* M2.11, в отличие от клеток *Xanthomonas sp.* Xav5, которые вызывали некрозы ткани. Таким образом, штамм *B.ginsengihumi* M2.11, продуцент фитазы, после инъекции в растительную ткань не проявлял

токсического действия на растение *N.tabacum* и может быть рекомендован в качестве биотехнологического объекта.

Итак, из разных образцов почв Республики Татарстан нами впервые выделен и идентифицирован штамм *B.ginsengihumi* M2.11, обладающий фитат-гидролизующей активностью. Ген фермента клонирован и секвенирован. Получен рекомбинантный штамм с высокой экспрессией гена фитазы бацилл. Впервые выделена и очищена внеклеточная фитаза *B.ginsengihumi* M2.11 из клеток рекомбинантного штамма, установлена первичная структура белка. Молекулярная масса фермента составила 41 кДа, изоэлектрическая точка рI 4.8. Первичная структура фитазы позволила установить ее принадлежность к классу  $\beta$ -пропеллерных фосфатаз, термостабильность и активность которых определяется наличием Са-связывающих сайтов в структуре фермента. Установлено, что фитаза *B. ginsengihumi* M2.11 узкоспецифична, оптимальной температурой для проявления каталитической активности является 37°C, оптимум рН действия равен 6.0, активность фитазы повышается на 20% в присутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  и  $\text{Mn}^{2+}$ . Установлено, что штамм *B.ginsengihumi* M2.11, продуцент фитазы, не обладает токсическим эффектом, стимулирует рост клеток растений и может быть рекомендован для разработки новых сельскохозяйственных биотехнологий на основе фитаз для увеличения урожайности растений.

## ВЫВОДЫ

1. Из образцов почв РТ выделен штамм *B.ginsengihumi* M2.11, обладающий фитат-гидролизующей активностью.
2. Ген фитазы клонирован, установлена его нуклеотидная последовательность; получен рекомбинантный штамм с эффективной экспрессией фитазы *B.ginsengihumi* M2.11.
3. Разработан метод выделения и очистки фитазы *B.ginsengihumi* M2.11 из клеток рекомбинантного штамма на основе аффинной хроматографии, установлена первичная структура фермента, фитаза является узкоспецифичной  $\beta$ -пропеллерной фосфатазой с изоэлектрической точкой рI 4.8. и молекулярной массой 41 кДа.
4. Штамм *B.ginsengihumi* M2.11 – продуцент фитазы – не обладает токсичностью по отношению к растениям табака и стимулирует рост и развитие картофеля.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ахметова А.И. Выделение и характеристика новой фитазы бацилл / А.И. Ахметова, Ч. Нямсурэн, Н.П. Балабан, М.Р. Шарипова // Биоорганическая химия. - 2013. - Т.39, № 4. - С.430-436. (перечень ВАК) - автора – 0.2 пл.
2. Ахметова А.И. Влияние клеточной магнетизации на рост и физиологические функции бацилл / А.И. Ахметова, Е.О. Михайлова, Р.Ф. Фахруллин, М.Р. Шарипова // Вестник Казанского технологического университета. - 2013. - №19. - С.203-207. (перечень ВАК) автора – 0.1 пл.
3. Тойменцева А.А. Штаммы *Bacillus pumilus* с инактивированными генами внеклеточных сериновых протеиназ / А.А. Тойменцева, А.И. Ахметова, М.Р. Каримова, Ч. Нямсурэн, Ю.О. Пономарева, Е.И. Шагимарданова, А.А. Ризванов, М.Р. Шарипова // Микробиология. - 2013. - Т.82, №1. - С.59. (перечень ВАК) автора – 0.2 пл.
4. Ахметова А.И. Фитазы как основа новых микробных технологий в кормлении животных / А.И. Ахметова, А.Д.Мухаметзянова, М.Р. Шарипова // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. - 2012. - Т. 154, кн. 2, - С. 103-110. (перечень ВАК) автора – 0.2 пл.
5. Мухаметзянова А. Д. Микроорганизмы как продуценты фитаз / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Микробиология. - 2012. - Т. 81, № 3. - С.1-10. (перечень ВАК) автора – 0.2 пл.
6. Шарипова М. Р. Новое филогенетическое положение штамма *Bacillus intermedius* 3-19 / М.Р. Шарипова, А.А. Тойменцева, А.Р. Сабирова, А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, А.М. Марданова, Н.П. Балабан // Микробиология. - 2011. Т.80, №3. - С.424-426. (перечень ВАК) автора – 0.1 пл.
7. Мухаметзянова А.Д. Изоляция и идентификация продуцентов фитаз, выделенных из образцов почв Республики Татарстан / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Казанская наука. - 2010. - №12. - С.24-28. (перечень ВАК) автора – 0.1 пл.
8. Мухаметзянова А.Д. Фитаза микроорганизмов как основа новых биоудобрений для улучшения роста растений / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р.Шарипова // Казанская наука. - 2010. - №1. - С.11-13. (перечень ВАК) автора – 0.1 пл.
9. Akhmetova A. Phytase of *Bacillus* sp. M2.11: cloning, expression and purification / A. Akhmetova, M. Sharipova // FEBS Journal. - 2013. - V. 280. Suppl. 1. - P. 609.
10. Chuluuntsetseg N. Development of transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a root-specific phytase of microbial origin / N. Chuluuntsetseg, L. Valeeva, A. Akhmetova, A. Suleymanova, N. Balaban, E. Shakirov, M. Sharipova // FEBS Journal - 2013. - V. 280, Suppl. 1. - P. 602.
11. Ахметова А.И. Лигазо-независимое клонирование. Учебно-методическое пособие / А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова. - Казань: Казанский (Приволжский) федеральный университет, 2013. - 14с.
12. Ахметова А.И. Выделение и очистка новой фитазы бацилл / А.И.Ахметова, М.Р. Шарипова // Материалы VI Российского Симпозиума «Белки и Пептиды». Уфа: 2013. - С. 257.
13. Ахметова А.И. Получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli*, способного к гиперпродукции фитазы бацилл // Материалы XX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», секция «Биоинженерия и биоинформатика». Москва: 2013. - С.1-2.



14. Нямсүрэн Ч. Гетерологичная система экспрессии генов в растениях на основе гена бациллярной фитазы / Ч. Нямсүрэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений». Москва: 2013. - С. 212-213.
15. Нямсүрэн Ч. Гетерологичная система экспрессии генов на основе гена фитазы бацилл / Ч. Нямсүрэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Сборник тезисов. 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пущино: 2013. – С. 368-359.
16. Нямсүрэн Ч. Получение трансгенных растений *Arabidopsis thaliana*, секретирующих микробную фитазу *phyCg Bacillus ginsengihumi* / Ч. Нямсүрэн, Л.Р. Валеева, А.И. Ахметова, А.Д. Сулейманова, Н.П. Балабан, Е.В. Шакиров, М.Р. Шарипова // Материалы XIII молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва: 2013. – С.39.
17. Ахметова А.И. Фитазы – микробные ферменты современной биотехнологии // Материалы XIX Международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», «Биоинженерия и биоинформатика». Москва: 2012. - С.1-2.
18. Ахметова А.И. Фитазы бацилл в повышении эффективности кормления животных / А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Материалы открытого конкурса научных работ студентов и аспирантов им. Н.И.Лобачевского. Казань: 2012, - С.42.
19. Ахметова А.И. Фитазы бацилл в повышении эффективности кормления животных // Материалы открытого конкурса научных работ студентов и аспирантов им. Н.И.Лобачевского. Казань: 2012. - С.317.
20. Akhmetova A.I. Bacillary phytase as a basis of effective animal feed / A.I. Akhmetova, M.R. Sharipova // Materials of XVI Symposium of Biology Students in Europe "SymBioSE 2012", Szeged and Godollo, Hungary: 2012. - P.59.
21. Ахметова А.И. Фитазы бацилл в повышении эффективности кормления животных / А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Материалы XI научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского (Приволжского) федерального университета «Материалы и технологии XXI века». Казань: 2012. - С.14.
22. Ахметова А.И. Клонирование и секвенирование гена фитат-гидролизующего фермента *Bacillus ginsengihumi* / А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Материалы международной конференции "Биология - наука XXI века". Москва: 2012. - С.75.
23. Akhmetova A.I. Identification of bacterias with high phytate degrading activity / A.I. Akhmetova, A.D. Mukhametzyanova, M.R. Sharipova // Materials of XV Symposium of Biology Students in Europe "SymBioSE 2011", Basel, Switzerland: 2011. - P.9.
24. Mukhametzyanova A.D. Characterization of *B.subtilis* strain with the knocked-out phytase gene / A.D. Mukhametzyanova, I.I. Marenova, A.I. Akhmetova, M.R. Sharipova // Materials of XV Symposium of Biology Students in Europe "SymBioSE 2011", Basel, Switzerland: 2011. - P.39.

25. Akhmetova A. Identification of bacterias with high phytate degrading activity / A.I. Akhmetova, M.R. Sharipova // Materials of III Annual International Scientific Conference in Biology, Tblisi, Georgia: 2011. – P.57.
26. Ахметова А.И. Изоляция бактерий с высоким уровнем секреции фермента, гидролизующего фитат / А.И. Ахметова, А.Д. Мухаметзянова, М.Р. Шарипова // Материалы Российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Казань: 2010. - С. 11.
27. Мухаметзянова А.Д. Идентификация продуцентов фитаз, выделенных из образцов почв Республики Татарстан / А.Д. Мухаметзянова, А.И. Ахметова, М.Р. Шарипова // Материалы Российской школы молодых ученых «Актуальные проблемы современной биохимии и молекулярной биологии». Казань: 2010. - С. 42.
28. Mukhametzyanova A.D. Phytases of microorganisms – the basis of new biofertilizers for plants' growth promotion / A.D. Mukhametzyanova, A.I. Akhmetova, M.R. Sharipova // Materials of Theoretical and practical biochemists' conference devoted to the memory of Prof. V.G. Vinter "History and Achievements of Kazan University Biochemistry School". Kazan: 2009. – P. 88.

E-mail автора: [akhmetova.alina@gmail.com](mailto:akhmetova.alina@gmail.com)

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание КФУ, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 д.б.н., проф. Абрамовой Зинаиде Ивановне., факс: (843) 238-76-01. E-mail: [ziabramova@mail.ru](mailto:ziabramova@mail.ru)

---

Подписано в печать 25.11.2013. Форм. бум. 60х84 1/16.  
Печ. л. 1,5. Тираж 100. Заказ № 2511/1.  
Отпечатано с готового оригинал – макета  
в типографии «Вестфалика» (ИП Колесов В.Н.)  
420111, г. Казань, ул. Московская, 22. Тел.: 292-98-92  
e-mail: westfalika@inbox.ru

---

$$10 =$$